Ensayo para (1→3)-β-D-Glucanos en suero

FUNGITELL®

Manual de instrucciones



PN001268-es Vers. 1 Revisado febrero de 2011

APLICACIÓN

El ensayo Fungitell es un ensayo colorimétrico basado en zimógenos de proteasas para la detección cualitativa de (1→3)-β-D-Glucanos en el suero de pacientes con síntomas o enfermedades que predispongan al paciente a una infección fúngica invasiva. La concentración sérica de (1→3)-β-D-Glucanos, uno de los principales componentes de la pared celular de varios hongos (1) considerados importantes desde el punto de vista médico, se puede utilizar como una ayuda en el diagnóstico de las micosis y las fungemias (2) muy arraigadas. Un resultado positivo no indicaría qué clase de hongos podrían estar causando la infección.

Fungitell se debe usar en conjunción con otros procedimientos de diagnóstico, como cultivos microbiológicos, examen histológico de muestras de biopsia y exploración radiológica.

Importante - Se recomienda facilitar esta información al médico solicitante:

El ensayo Fungitell no detecta ciertas especies fúngicas como el género *Cryptococcus* que produce niveles muy bajos de (1→3)-β-D-Glucanos (3,4). El ensayo tampoco detecta los Zygomycetes como *Absidia*, *Mucor* y *Rhizopus* (1,4) debido a que no se tiene constancia de que produzcan (1→3)-β-D-Glucanos. Además, la fase levaduriforme de *Blastomyces dermatitidis* produce pocos (1→3)-β-D-Glucanos y no pueden ser detectados por el ensayo (5).

Incluir esta declaración al notificar los resultados de las pruebas del ensayo de Glucano.

SUMARIO Y EXPLICACIÓN

Existe un aumento en la incidencia de infecciones fúngicas por patógenos oportunistas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (6,7,8). Las infecciones fúngicas invasivas, como infecciones oportunistas, son habituales entre los pacientes con cáncer hematológico y con SIDA, y dan cuenta de un creciente número de infecciones nosocomiales, especialmente entre los receptores de trasplantes de órganos y otros pacientes que reciben tratamientos inmuno-supresores (9,10). Muchas infecciones fúngicas se adquieren inhalando esporas fúngicas que surgen de la tierra, de detritus de plantas, de sistemas de aire acondicionado y/o de superficies expuestas. Algunos hongos oportunistas están presentes en la piel humana, el tracto intestinal y en las membranas mucosas (11,12). El diagnóstico de las micosis y fungemias invasivas se basa normalmente, en un diagnóstico no específico o en técnicas radiológicas. Recientemente, se han añadido marcadores biológicos de infecciones fúngicas a los métodos de diagnóstico disponibles (2).

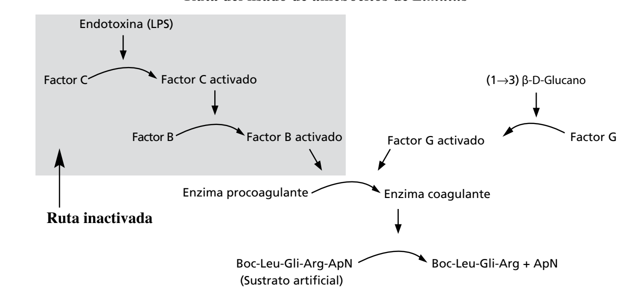
Los patógenos fúngicos oportunistas incluyen: *Candida spp. y Aspergillus spp., Fusarium spp., Trichosporon spp., Saccharomyces cerevisiae, Acremonium spp., Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Sporothrix schenckii* y *Pneumocystis jirovecii.* Los (1→3)-β-D-Glucanos producidos por éstos y otros organismos se pueden detectar mediante el ensayo Fungitell (1,8,13).

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo Fungitell mide los niveles de (1→3)-β-D-Glucanos. El ensayo se basa en una modificación de la ruta del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (14,15,16,17), Figura 1. El reactivo Fungitell se modifica para eliminar el Factor C y, de este modo, reaccionar sólo los (1→3)-β-D-Glucanos, a través del lado de la ruta mediada por el Factor G.

Los (1→3)-β-D-Glucanos activan el Factor G, un zimógeno de serín proteasa. El Factor G activado convierte la enzima procoagulante inactiva en la enzima coagulante activa que, a su vez, divide el ApN del sustrato péptido cromogénico, Boc-Leu-Gli-Arg-ApN, creando un cromóforo que absorbe a 405 nm. El ensayo cinético Fungitell, descrito abajo, se basa en la determinación de la tasa de aumento de la densidad óptica aportada por una muestra. Esta tasa se interpreta en relación con una curva estándar para producir cálculos aproximados de la concentración de (1→3)-β-D-Glucanos en la muestra.

FIGURA 1
Ruta del lisado de amebocitos de *Limulus*



MATERIALES FACILITADOS CON EL KIT FUNGITELL

El kit Fungitell es para el uso diagnóstico *in vitro*. Los siguientes materiales facilitados con cada kit son suficientes para analizar 110 pocillos en dos micro placas (55 pocillos en cada una):

1. Reactivo Fungitell®, un LAL liofilizado específico para (1→3)-β-D-Glucanos (dos viales)
2. Disolución amortiguadora Pyrosol®, Tris-HCl 0,2 *M* pH 7,4 (dos viales). Los viales adicionales de disolución amortiguadora Pyrosol (código de catálago BC051) se pueden adquirir por separado.
3. Estándar de glucanos, paquimano liofilizado y relleno inerte con el contenido de (1→3)-β-D-Glucanos indicado en la etiqueta (dos viales)
4. Reagent Grade Water (RGW). Agua libre de (1→3)-β-D-Glucanos detectables (dos botellas)
5. Pyroplates: microplacas no revestidas, de fondo plano, con 96 pocillos, con cubiertas, libres de glucanos interferentes (dos)
6. KCl 1,2 *M* (un vial)
7. KOH 0,25 *M* (un vial)

Todos estos materiales, a excepción del estándar, están libres de niveles interferentes de (1→3)-β-D-Glucanos.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

Todos los materiales deben estar libres de glucanos interferentes. Los materiales de cristal deben secarse mediante un proceso de despirogenización a calor seco por lo menos a 235 ºC durante 7 horas (o un equivalente validado) para que puedan considerarse adecuados para el uso.

1. Puntas de pipeta* (250 µL – Nº de cat. PPT25, 1000 µL – Nº de cat. PPT10)
2. Pipeta capaz de dispensar volúmenes de 5-25 µL y de 100-1000 µL
3. Pipeta de repetición, con puntas de jeringa, capaz de dispensar 100 µL
4. Tubos de ensayo* para la preparación de la serie estándar y combinar reactivos del tratamiento del suero. (Vidrio de borosilicato de 13 x 100 mm – N º de cat. TB013)
5. Lector de placas de incubación (37 °C) capaz de monitoriar la longitud de onda dual, a 405 y 490 nm, con una gama dinámica de hasta, al menos, 2,0 Unidades de Absorbancia, relacionado con un software apropiado para ensayos cinéticos por computador.
6. Tubos de dilución con tapa de rosca, estériles y libres de glucanos para dividir las muestras en alícuotas (la mayoría de los tubos que están certificados como libres de pirógenos, ARNasa y ADNasa están libres de (1→3)-β-D-Glucanos interferentes).
7. Parafilm®

* Estos productos, proporcionados por Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), están certificados como libres de glucanos interferentes.
Advertencia: las pipetas de vidrio con tapones de algodón son una fuente potencial de contaminación por glucanos.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

***Este producto es para el USO DIAGNÓSTICO* IN VITRO.**

El ensayo Fungitell exige una atención rigurosa a la técnica y al entorno de pruebas. Una formación rigurosa del técnico en el método de ensayo y en evitar la contaminación es fundamental para la eficacia del ensayo.

1. Algunas especies fúngicas producen niveles muy bajos de (1→3)-β-D-Glucanos y normalmente no son detectados por el ensayo Fungitell. Estas especies incluyen el género *Cryptococcus* (3,4), así como los Zygomycetes como *Absidia, Mucor y Rhizopus* (1,4). Además, *Blastomyces dermatididis*, en su forma levaduriforme, produce niveles bajos de (1→3)-β-D-Glucanos y, por lo tanto, no suele ser detectado por el ensayo Fungitell (5).
2. No pipetear ningún material con la boca. No fumar, comer o beber en áreas donde se manipulen muestras o reactivos del kit.
3. Establecer un entorno limpio donde se realizará el ensayo. Usar materiales y reactivos que estén certificados como libres de (1→3)-β-D-Glucanos interferentes. Hay que tener en cuenta que los glucanos, provenientes de la contaminación fúngica del cuerpo humano, ropa, recipientes, agua y polvo del aire, pueden provocar interferencia en el ensayo Fungitell.
4. No usar reactivos después de la fecha de expiración.
5. Las muestras turbias o con una coloración anormal como las que están extremadamente hemolizadas, lipémicas o que contienen un exceso de bilirrubina pueden provocar interfe-rencias. Si se analizan, los resultados de las pruebas se deben examinar para determinar si hay signos de interferencia óptica y/o patrones de señales cinéticas poco usuales.
6. Utilizar ropa protectora adecuada y guantes libres de polvo al manipular muestras de pacientes.
7. El suero de los pacientes en hemodiálisis puede contener niveles elevados de (1→3)-β-D-Glucanos cuando se utilizan ciertas membranas de celulosa para diálisis (18,19). La hemodiálisis con membranas de triacetato de celulosa o membranas de polimetilmetacrilato no parece afectar al ensayo.
8. Las esponjas y las gasas quirúrgicas pueden filtrar niveles elevados de (1→3)-β-D-Glucanos que pueden contribuir a un resultado positivo transitorio basado en la contaminación del ensayo Fungitell, tal como se ha observado en pacientes posquirúrgicos (20,21).
9. No se deben usar los kits con contenidos dañados.
10. Los materiales expuestos a fluidos (que contienen patógenos) potencialmente contaminados se deben desechar de una forma acorde a las normativas regulatorias locales.

Conservación de los reactivos

Guardar todos los reactivos, tal como se suministran, de 2-8 ºC en un lugar oscuro. El reactivo Fungitell reconstituido se debe conservar a 2-8 ºC y se debe utilizar dentro de 2 horas despues de su reconstitución. De forma alternativa, el reactivo Fungitell reconstituido puede congelarse a –20 ºC durante un máximo de 20 días, descongelarse una vez y utilizarse.

Manipular las muestras

1. Obtención de muestras: las muestras de suero se deben recoger en tubos estériles al vacío (tapones rojos), o tubos separadores de suero (SST) y dejar que se coagulen. Entonces el suero se separa del coágulo y se decanta en un recipiente apropiado que esté libre de (1→3)-β-D-Glucanos interferentes.
2. Conservación de muestras: las muestras de suero se pueden conservar a 2-8 ºC antes del ensayo, o congelar a temperaturas de -20 ºC o mayores. La prueba se debe realizar cuanto antes para evitar la posibilidad de que se degrade la muestra.
3. Etiquetado de muestras: las muestras se deben etiquetar claramente de acuerdo con las prácticas autorizadas de la institución.

PROCEDIMIENTO

Nota: las configuraciones pueden variar con los diferentes instrumentos y software. En general, se aplicará lo siguiente: configurar el software del lector de placas para recopilar datos en el modo V_{medio}. Comprobar las configuraciones apropiadas en el manual de software para garantizar que el valor calculado sea la tasa media del cambio de la densidad óptica para todos los puntos de datos recopilados. Ajuste el intervalo entre las "lecturas" del instrumento al mínimo permitido por el software y el instrumento por encima del periodo de 40 minutos de la prueba. Las configuraciones de la longitud de onda del software deben ser de 405 nm menos la señal de fondo de 490 nm. Si la lectura de la longitud de onda dual no está disponible, realizar la lectura a 405 nm. La temperatura de incubación se debe establecer a 37 ºC. La agitación de placas debe tener lugar, durante 5 – 10 segundos, antes del inicio de la lectura. La configuración del ajuste de la curva debe ser "lineal/lineal" o equivalente. La lectura debe comenzar sin ningún tiempo de demora.

1. Preparación del estándar de glucanos facilitado en el kit.
   a. Disolver un vial del estándar de glucanos con el volumen de RGW que se indica en el vial, para hacer una solución de 100 pg/mL. Mezclar en vórtex durante al menos 30 segundos para volver a suspender (solución 1). La solución de glucanos debe conservarse a 2-8 ºC y usarse dentro de los tres días posteriores. Los pasos b-e que se detallan a continuación ilustran un ejemplo de un esquema de preparación de la curva estándar.
   b. Preparar el estándar de 50 pg/mL mezclando 500 µL de RGW y 500 µL de la solución 1 en un tubo libre de glucanos (solución 2). Mezclar en vórtex durante al menos 10 segundos.
   c. Preparar el estándar de 25 pg/mL mezclando 500 µL de RGW y 500 µL de la solución 2 en un tubo libre de glucanos (solución 3). Mezclar en vórtex durante al menos 10 segundos.
   d. Preparar el estándar de 12,5 pg/mL mezclando 500 µL de RGW y 500 µL de la solución 3 en un tubo libre de glucanos (solución 4). Mezclar en vórtex durante al menos 10 segundos.
   e. Preparar el estándar de 6,25 pg/mL mezclando 500 µL de RGW y 500 µL de la solución 4 en un tubo libre de glucanos (solución 5). Mezclar en vórtex durante al menos 10 segundos.
2. Preparación del reactivo del pretratamiento del suero. El reactivo alcalino del pretra-tamiento del suero convierte los glucanos de triple hélice en glucanos de hebra simple (16,17) que son más reactivos en el ensayo. El pH elevado también inactiva las serín proteasas y los inhibidores de serín proteasas en suero lo que puede dar un resultado falso positivo y falso negativo, respectivamente (22).
   a. Preparar el reactivo del pretratamiento del suero combinando volúmenes iguales de 0,25 *M* KOH y 1,2 *M* KCl, y mezclando bien en vórtex. Los volúmenes recomendados son de hasta 900 µL de cada reactivo, permitiendo dos preparaciones. Cubrir los viales con Parafilm para el uso con la segunda placa. Cubrir el vial con Parafilm usando el lado del Parafilm que estaba orientado hacia el papel.

   i. Nota: al trazar la curva estándar, multiplicar la concentración de los estándares por cinco de manera que el intervalo sea de 500 hasta 31 pg/mL. Introduzca los estándares en las configuraciones del software como 500, 250, 125, 62,5 y 31 pg/mL, respectivamente.

El volumen del estándar en el ensayo es 25 µL por pocillo o cinco veces el volumen de la muestra de suero. La micro placa con los estándares (est), controles negativos (neg) y 21 desconocidos (dsc) cada uno analizado por duplicado está configurada como sigue:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Est1	Est1		Dsc1	Dsc4	Dsc7	Dsc10	Dsc13	Dsc16	Dsc19	
C		Est2	Est2		Dsc1	Dsc4	Dsc7	Dsc10	Dsc13	Dsc16	Dsc19	
D		Est3	Est3		Dsc2	Dsc5	Dsc8	Dsc11	Dsc14	Dsc17	Dsc20	
E		Est4	Est4		Dsc2	Dsc5	Dsc8	Dsc11	Dsc14	Dsc17	Dsc20	
F		Est5	Est5		Dsc3	Dsc6	Dsc9	Dsc12	Dsc15	Dsc18	Dsc21	
G		Neg	Neg		Dsc3	Dsc6	Dsc9	Dsc12	Dsc15	Dsc18	Dsc21	
H												

Nota 1: los pocillos externos se pueden utilizar, si se ha demostrado que los resultados de estos son comparables a los de los pocillos internos.
Nota 2: para evitar la contaminación accidental, sustituir la tapa de la microplaca después de añadir muestras y reactivos a los pocillos. Retirar la tapa antes de colocar la placa en el lector para evitar interferencias ópticas causadas por el vaho.

3. Adición de suero y reactivo del pretratamiento.
   a. Descongelar las muestras de suero congelado a temperatura ambiente. Mezclar bien todas las muestras en vórtex.
   b. Transferir 5 µL de la muestra de suero a cada uno de sus pocillos (Dsc) designados, como mínimo, por duplicado. Repetir para cada muestra de suero.
   c. Añadir 20 µL del reactivo del pretratamiento del suero a cada pocillo que contenga suero.

   Nota: los pasos b y c se pueden llevar a cabo en orden inverso de acuerdo con las preferencias del técnico.
   d. Agitar la placa durante 5 – 10 segundos para mezclar el contenido de los pocillos (se puede usar la función de agitación de placas del lector), a continuación incubar durante 10 minutos a 37 ºC en el lector de placas de incubación.
4. Reconstitución del reactivo Fungitell. Nota: esto se puede realizar convenientemente mientras la incubación del pretratamiento está en curso.
   a. Reconstituir un vial del reactivo Fungitell añadiendo 2,8 mL de RGW y, a continuación, añadiendo 2,8 mL de disolución amortiguadora Pyrosol usando la pipeta de 1000 µL. Cubrir el vial con Parafilm usando el lado del Parafilm. Mezclar cuidadosamente el vial para disolver por completo – no mezclar en vórtex.
5. Adición de controles negativos y estándares de glucanos. Al final de la incubación del pretratamiento del suero (paso 3.d), retirar la placa del lector de placas de incubación y añadir los estándares y controles negativos a la placa.
   a. Añadir 25 µL de RGW a los pocillos G2 y G3.
   b. Añadir 25 µL de la solución estándar 5 de 6,25 pg/mL a los pocillos F2 y F3.
   c. Añadir 25 µL de la solución estándar 4 de 12,5 pg/mL a los pocillos E2 y E3.
   d. Añadir 25 µL de la solución estándar 3 de 25 pg/mL a los pocillos D2 y D3.
   e. Añadir 25 µL de la solución estándar 2 de 50 pg/mL a los pocillos C2 y C3.
   f. Añadir 25 µL de la solución estándar 1 de 100 pg/mL a los pocillos B2 y B3.
6. Adición del reactivo Fungitell y procedimiento de incubación de la placa.
   a. Añadir 100 µL del reactivo Fungitell a cada pocillo (con controles negativos, estándares y muestras) usando la pipeta de repetición.
   b. Insertar la placa en el lector de microplacas (calibrado a 37 ºC) con la tapa puesta y agitarlo durante 5 – 10 segundos. Realizar la lectura de la placa sin la tapa a 405 nm menos 490 nm, durante 40 minutos a 37 ºC. Si la sustracción de fondo (a 490 nm) no está disponible, es aceptable realizar la lectura a 405 nm. Si no hay disponible una función de agitación de placas con el lector de microplacas, se puede utilizar un agitador de microplacas externo.
   c. Recopilar los datos y analizar del siguiente modo: examinar los trazos de densidad óptica de las muestras de prueba y comprobar los patrones de señales cinéticas diferentes al aumento de suavidad comparables a los de los estándares. Invalidar los trazos que indican interferencias ópticas. Calcular la tasa media del cambio de la densidad óptica (unidades de miliabsorbancia por minuto) para todos los puntos entre 0 y 40 minutos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del test Fungitell se deben usar como ayuda en el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas. Los resultados se expresan en pg/mL de suero y rango desde no detectable (<31 pg/mL) a > 500 pg/mL, y son imprimidos por el software o leídos desde la curva estándar. Los valores exactos por encima de 500 pg/mL requieren que la muestra se diluya en RGW y que se vuelva a analizar.

El laboratorio que realice la prueba debe informar al médico solicitante de que el test Fungitell no detecta ciertas especies fúngicas como el género *Cryptococcus* (3,4) que produce niveles muy bajos de (1→3)-β-D-Glucanos. El ensayo tampoco detecta los *Zygomycetes* como *Absidia*, *Mucor* y *Rhizopus* (1,4) que no se tiene constancia de que produzcan (1→3)-β-D-Glucanos. Asimismo, *Blastomyces dermatitidis*, en su fase levaduriforme, produce poco (1→3)-β-D-Glucanos, y normalmente son indetectable (5).

RESULTADO NEGATIVO
Los valores de (1→3)-β-D-Glucanos < 60 pg/mL se interpretan como resultados negativos.

RESULTADO POSITIVO
Los valores ≥80 pg/mL se interpretan como positivos. Un resultado positivo significa que se detectaron (1→3)-β-D-Glucanos. Un resultado positivo no define la presencia de una enfermedad y se debe utilizar en conjunción con otros criterios clínicos para establecer un diagnóstico.

RESULTADO INDETERMINADO
Los valores de 60 a 79 pg/mL indican una posible infección fúngica. Se recomienda un muestreo y pruebas adicionales de los sueros. El muestreo y las pruebas frecuentes mejoran la utilidad para el diagnóstico.

CONTROL DE CALIDAD
- El coeficiente de correlación (r) de la curva estándar (lineal vs lineal) debe ser > 0,980.
- Los pocillos (25 µL de RGW) son los controles negativos. Los controles negativos deben tener valores reales del índice de densidad óptica (V_{medio}) inferiores al 50% del estándar más bajo. Si no, el ensayo se debe repetir usando todos los reactivos nuevos.
- Manipular las muestras problemáticas. Si el analista observa cinéticas de densidad óptica inusuales en un test de una muestra borrosa, con una coloración anormal o turbia (como las que están extremadamente hemolizadas, lipémicas o que contienen un exceso de bilirrubina), la muestra se debe diluir en RGW y se debe volver a analizar. La dilución debe ser incluida en el informe de resultados multiplicando el resultado por el factor de dilución. Generalmente, el factor de dilución se introduce en la configuración del software para la muestra y la corrección se aplica automáticamente.
- Las muestras de control, en los niveles de corte y altamente positivos, pueden ser ensayados para verificar que los reactivos y el ensayo están funcionando correctamente. Cada usuario de la prueba debe fijar un programa de control de calidad para garantizar la competencia en la realización de la prueba.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA
1. Las localizaciones del tejido de infección fúngica (10), encapsulación y la cantidad de (1→3)-β-D-Glucanos producida por ciertos hongos puede afectar a la concentración sérica de este análito. La disminución de la capacidad de aportar (1g3)-β-D-Glucanos a la circulación sanguínea puede reducir la capacidad de detectar ciertas infecciones fúngicas. Los *Cryptococcus spp*. producen bajos niveles de (1-3)-β-D-Glucanos (3,4). No se tiene constancia de que los Zygomycetes, incluidos *Absidia spp*., *Mucor spp*. y *Rhizopus spp*. (1,4), produzcan (1→3)-β-D-Glucanos. *Blastomyces dermatitidis*, en su fase levaduriforme, produce poco (1→3)-β-D-Glucanos, y los resultados de la prueba suelen ser negativos (5).
2. Algunos individuos tienen niveles elevados de (1→3)-β-D-Glucanos que entran en la zona indeterminada. En tales casos, se recomienda realizar una prueba adicional.
3. La frecuencia de las pruebas del paciente dependerá del riesgo relativo de infección fúngica. Se recomienda una frecuencia de muestreo de, al menos, dos a tres veces por semana para los pacientes de riesgo.
4. Se han encontrado resultados positivos en pacientes en hemodiálisis (18,19), sujetos tratados con ciertos hemoderivados fraccionados como la albúmina sérica y las inmunoglobulinas (23) y en muestras o sujetos expuestos a gasas que contienen glucanos. Los pacientes necesitan 3 – 4 días para el restablecimiento de los niveles iniciales de (1→3)-β-D-Glucanos en suero, después de la exposición quirúrgica a esponjas y gasas que contengan (1→3)-β-D-Glucanos (20,21). En consecuencia, se debe tomar esto en cuenta en el desarrollo cronológico del muestreo de los pacientes quirúrgicos.
5. Las muestras obtenidas por métodos de punción en el talón o en el dedo no son aceptables ya que se ha demostrado que la gasa empapada en alcohol usada para preparar la zona (y, potencialmente, la acumulación de sangre en la superficie de la piel) contamina las muestras.
6. Los niveles de las pruebas se fijaron en los sujetos adultos. Los niveles pediátricos normales se aproximan a los de los adultos (24). No se tienen datos de los recién nacidos y los bebés menores de seis meses.
7. El rango reportable del ensayo es 31 pg/mL a 500 pg/mL. Los valores inferiores a 31 pg/mL se deben notificar como < 31 pg/mL. Los valores >500 pg/mL se deben notificar como > 500 pg/mL, a menos que se haya diluido la muestra.

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN
Las siguientes condiciones de las muestras pueden afectar al resultado de un ensayo preciso de Fungitell:
- Hemólisis
- Turbidez de la muestra causada por lipemia
- La presencia de bilirrubina evidente a simple vista
- Suero turbio

VALORES ESPERADOS
Los valores de beta-glucanos son elevados en una variedad de infecciones fúngicas. Cuando los signos y los síntomas están presentes en el nivel de 80 pg/mL o superior, el valor predictivo que indica que el sujeto da positivo para una infección fúngica varía de 74,4 a 91,7% (Tabla 2). En ausencia de signos y síntomas inferiores a 60 pg/mL, los valores predictivos negativos variaban de 65,1% a 85,1%.

CARACTERÍSTICAS DEL PROCEDIMIENTO
Pruebas de comparación
Se realizó un estudio prospectivo, multicéntrico para validar las características del procedimiento del ensayo Fungitell (25). La prueba se comparó con otros métodos estándar de detección (es decir, hemocultivo, examen histopatológico de la muestra de la biopsia y signos radiológicos) para micosis y fungemias.

Se analizaron trescientos cincuenta y nueve (359) sujetos en el ensayo. Se obtuvo una sola muestra de cada sujeto. Los sujetos de bajo riesgo incluían a los individuos aparentemente sanos y a aquellos de los centros clínicos que fueron ingresados en los hospitales por otros motivos distintos de las infecciones fúngicas. La inscripción de sujetos se realizó en seis centros clínicos de Estados Unidos. Cuatro de los centros clínicos realizaron el ensayo y analizaron un total de 285 muestras. ACC analizó las 359 muestras dos veces pero sólo utilizó el segundo grupo de resultados para determinar los resultados del ensayo. Los resultados del segundo grupo de análisis no fueron estadísticamente diferentes del primer grupo.

La sensibilidad de la población total de sujetos (359) incluido *Cryptococcus* fue de 65,0% [60,1 – 70,0% Intervalo de Confianza (CI)]. La especificidad fue de 81,1% (77,1 – 85,2% CI) (Tabla 1). Los resultados de los cuatro centros de pruebas tuvieron un rango de sensibilidad de 50,0% a 66,7%. El rango de especificidad varió de 70,0% a 93,0% en las 285 muestras analizadas (Tabla 2).

Tabla 1 Resultados de las pruebas de ACC en el nivel de corte de 60-80 pg/mL por centro

Centro	Comprobado/Probable **Sensibilidad** >=80pg/mL			**Especificidad** <60pg/mL			Dudoso 60<=X<80	Total
	Pos/Pos. clin	**Sensibilidad**	Valor predictivo positivo	Neg/Neg. clin	**Especificidad**	Valor predictivo negativo		
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6	1	90
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8	5	44
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0	3	73
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0	6	76
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8	6	75
6	0/1	0,0	N/D	0/0	N/D	0,0	0	1
Total*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

***Incluye una muestra del Centro 6.**
Cuando los resultados obtenidos por ACC (359 muestras) y por los centros clínicos (285 muestras) se comparan con el diagnóstico clínico, la sensibilidad es de 64,3% (58,8% - 69,9% CI) para ACC y de 61,5% (55,9% - 67,2% CI) para los centros. La especificidad es de 86,6% (82,7% - 90,6% CI) para ACC versus 79,6% (74,9% - 84,3% CI) para los centros (Tabla 2).

Tabla 2 Resultados de los centros de pruebas en el nivel de corte de 60-80 pg/mL por centro

Centro	Comprobado/Probable **Sensibilidad** >=80pg/mL			**Especificidad** <60pg/mL			Dudoso 60<=X<80	Total
	Pos/Pos. clin	**Sensibilidad**	Valor predictivo positivo	Neg/Neg. clin	**Especificidad**	Valor predictivo negativo		
1	32/50	64,0	74,4	28/40	70,0	65,1	4	90
2	12/24	50,0	75,0	15/20	75,0	65,2	5	44
3 *								
4	22/33	66,7	91,7	40/43	93,0	85,1	5	76
5	22/36	61,1	78,6	30/39	76,9	75,0	7	75
6 *								
Total, Centros	88/143	61,5	79,3	113/142	79,6	73,9	21	285
ACC	92/143	64,3	91,1	123/142	86,6	74,1	18	285

*** No es un centro de pruebas.**

CANDIDIASIS
Hubo 107 sujetos a los que se les diagnosticó candidiasis en el estudio prospectivo. 83 de los 107 resultaron positivos en el ensayo Fungitell.

Se facilitaron ciento setenta y cinco (175) muestras de archivo de candidiasis a Associates of Cape Cod. 145 de las 175 resultaron positivos en el ensayo.

ASPERGILOSIS
Un total de 10 sujetos dieron positivo para aspergilosis. 8 de los 10 resultaron positivos en el ensayo.

FUSARIOSIS
Tres sujetos dieron positivo para fusariosis. 2 de los 3 resultaron positivos en el ensayo.

TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO
La presencia o la ausencia de tratamiento antifúngico no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo en la sensibilidad del ensayo. 118 sujetos resultaron positivos para la infección fúngica invasiva y recibían tratamiento antifúngico. 82 resultaron positivos en el ensayo (sensibilidad, 69,5%; 61,2% - 77,8% CI). Además, veinticuatro (24) sujetos dieron positivo, pero no recibían ningún tratamiento antifúngico. 18 resultaron positivos en el ensayo (sensibilidad, 75%; 57,7% - 92,3% CI).

ESPECIFICIDAD
Un total de 170 sujetos dieron negativo para la infección fúngica y, aparentemente, eran individuos sanos. La especificidad fue del 86,5% con el ensayo (82,8% - 90,1% CI). Cuando los 26 sujetos adicionales que dieron negativo para la infección fúngica pero con otros trastornos fueron incluidos, se observó una especificidad del 81,1% (77,1 – 85,2% CI).

CORRELACIONES DE LAS PRUEBAS
Cuatro de los centros clínicos analizaron un total de 285 muestras. Los resultados de las pruebas de los centros estaban correlacionados cuantitativamente en el 96,4% con los resultados de Cape Cod. Las correlaciones de Associates of Cape Cod con los diferentes centros de pruebas variaron de 90,6 a 99,2%.

PRECISIÓN
En los Estudios de Precisión, diez (10) muestras diferentes fueron analizadas por tres centros de pruebas, en tres días diferentes. La variación intraensayo varió de 0,9 a 28,9%. Los valores del interensayo variaron de 3,9 a 23,8%. Las cuatro (4) muestras negativas fueron excluidas de ambos análisis.

REFERENCIAS

1. Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. Medical Mycology 44: 267-272.
2. De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infeectious disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Concensus Group. Clin. Inf. Dis. 46: 1813-1821.
3. Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K-I., Ishikawa, N., and Hara, K. 1995. Plasma (1→3)-ß-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. J. Clinical Microbiol. 33: 3115-3118.
4. Mitsuya, M., Wada, K. and Yamaguchi, H. 1994. In vitro studies on the release of G Test-positive (1→3)-ß-D-glucans from various fungal pathogens. In Committee on Organic Dusts, ICOH, Report 1/94, Rylander, R. and Goto, H. editors. pp 29-37.
5. Girouard, G., Lachance, C., and Pelletier, R. 2007. Observations of (1→3)-ß-D-glucan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by *Histoplasma* or *Blastomyces*. J. Med. Mycology 56: 1001-1002.
6. Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infectious Dis. 1999: 1:247-261.
7. Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. New England Journal of Medicine. 1998: 338:1741-1751.
8. Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H. Yasuoka, A., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horichi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K., and Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)-ß-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 345: 17-20.
9. Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin. Micro. Rev. 9: 499-511.
10. Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl. Infectious Dis. 2002: 4 (Suppl. 3):32-37
11. Lass-Florl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197-205.
12. Nucci, M. and Anaissie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295-306.
13. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarijian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2004. ß-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. CID 39: 199-205.
14. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.
15. Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (13)-ß-D-glucans. Carbohydrate Res. 218:167-174.
16. Saito, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1→3)-ß-D-glucans in the activation of coagulation factor G from *Limulus* amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.
17. Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., and Saito, H. 1993. Activation of *Limulus* coagulation factor G by several (1→3)-ß-D-glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683-686.
18. Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-ß-D-glucan level. Kidney International 60: 319-323.
19. Kato, A., Takita, T, Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-ß-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
20. Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakat, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-ß-D-glucan derived from different gauze types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.
21. Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of ß-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
22. Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T, and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-ß-D-glucan in human blood. Clin. Chim. Acta 226: 109-112.
23. Ogawa, M., Hori, H., Niiguchi, S., Azuma, E., and Komada, Y. 2004. False positive plasma (1→3)-ß-D-glucan following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow recipient. Int. J. Hematol. 80: 97-98.
24. Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A., and Steinbach, W.J. 2007. (1→3)-ß-D-glucan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-glucan test in children. Clin. Vaccine Immunol. 14: 924-925.
25. Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Saeki, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1→3)-ß-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin. Inf. Dis. 41: 299-305.

REFERENCIAS ADICIONALES NO MENCIONADAS

A) Desmet, S., Van Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbeken, E., De Munter, P., Meersseman, W., Van Meensel, B., Van Eldere, J., Lagrou K. 2009. Serum (1→3)-ß-D-glucan as a diagnostic tool for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection or hematological malignancy. J. Clin. Microbiol. 47: 3871-3874.
b) Koo, S., Bryar. J.M., Page. J.H., Baden. L.R., Marty, F.M. 2009. Diagnostic performance of the (1→3)-ß-D-glucan assay for invasive fungal disease. Clin. Infect. Dis. 49:1650-9.
c) Ellis, M., Ramadi, B., Finkelman, M., Hedstrom, U., Kristenson, J., Ali-Zadeh, H., and Klingspor, L. 2007. Assessment of the clinical utility of serial ß-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. J. Med. Microbiol. 57: 287-95.
d) Marty, F.M., Lowry, C.M., Lempitski, S.J., Kubiak, D.W., Finkelman, M.A., and Baden, L. R., 2006. Reactivity of (1→3)-ß-D-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemo. 50: 3450-3453.
e) Marty, F. M., Koo, S., Bryar,and J., and Baden, L.R. 2007. (1→3)-ß-D-glucan assay positivity in patients with *Pneumocystis (carinii) jiroveci* pneumonia. Ann. Int. Med. 147: 70-72.
f) Obayashi, T., Yoshida, M., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Kawai, T. 1992. Determination of plasma (1→3)-ß-D-glucan: A new diagnostic aid to deep mycosis. J. Medical and Vet. Mycol. 30: 275-280.
g) Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T., and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-ß-D-glucan in human blood. Clinica Chimica Acta 226: 109-112.
h) Yasuoka, A., Tachikawa, N., Shimada, K., Kimura, S., and Oka, S. 1996. (1→3)-ß-D-glucan as a quantitative serological marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia. Clinical and Diagnostic. Lab. Immuno. 3: 197-199.
i) Yoshida, M., Obayashi, T., Iwama, A., Ito, M., Tsunoda, S., Suzuki, T., Muroi, K. Ohta, M., Sakamoto, S., and Miura, Y. 1997. Detection of plasma (1→3)-ß-D-glucan in patients with *Fusarium, Trichosporon, Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias. J. Med. Vet. Mycology 35:371-374.
j) Yuasa, K., Goto, H., Iguchi, M., Okamura, T., and Ieki, R. 1996. Evaluation of the diagnostic value of the measurement of (1→3)-ß-D-glucan in patients with pulmonary aspergillosis. Respiration 63: 78-83.

LEYENDA DE LOS SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
	“Utilizar antes de”
Σ N	**“Contenido suficiente para <n> ensayos”**
LOT	**“Código de lote”**
IVD	**“Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*”**
REF	**“N º de catálogo”**
	“Límite de temperatura”
	“Fabricante”
	“Consulte las instrucciones de uso”
EC REP	**“Representante autorizado”**
CE	**“Marcado CE”**

EC REP **Associates of Cape Cod International, Inc.**
Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Reino Unido